

МНОЖЕСТВЕННАЯ ЛЕКАРСТВЕННАЯ УСТОЙЧИВОСТЬ И ИНТЕГРОНЫ 1-го КЛАССА КЛИНИЧЕСКИХ ИЗОЛЯТОВ *SALMONELLA* *ENTERICA* СЕРОТИПА ENTERITIDIS, ЦИРКУЛИРУЮЩИХ В АРМЕНИИ

А.М. Седракян¹, К.А. Аракелова¹, М.К. Закарян¹, А.И. Оганнисян¹, А.В. Асоян²,
З.У. Геворкян², А.А. Мнацаканян², Ж.А. Кцоян¹, А.С. Бояджян¹, Р.И. Аминов³

¹ Институт молекулярной биологии Национальной Академии Наук Республики Армения, Ереван, Армения

² Инфекционная клиническая больница «Норк» МЗ Республики Армения, Ереван, Армения

³ Национальный ветеринарный институт, Технический университет Дании, Копенгаген, Дания

Резюме. Целью настоящей работы было выявление интегронов 1-го класса и исследование их роли в формировании фенотипов резистентности к антимикробным препаратам штаммов *Salmonella enterica* подвида *enterica* серотипа Enteritidis. Штаммы *S. Enteritidis* (n = 29) были изолированы от больных сальмонеллезом в Инфекционной клинической больнице «Норк» (Ереван, Республика Армения). В тестированной выборке изолятов выявлен высокий уровень множественной лекарственной устойчивости (МЛУ) и обнаружены фенотипы полирезистентности, редкие для серотипа *S. Enteritidis*. Интегроны 1-го класса были выявлены в 27,6% изолятов, с преобладанием вариабельного сегмента в 1000 п.н. Среди интегрон-положительных изолятов фенотип МЛУ был более распространен по сравнению с интегрон-отрицательными изолятами *S. Enteritidis*. Необходимо продолжить исследования для выяснения генетических основ МЛУ и оценки степени родственности тестированных клинических изолятов. Результаты настоящей работы свидетельствуют о быстром и ширококомасштабном проникновении генов резистентности к антибиотикам в популяции *S. Enteritidis*, что затрудняет контроль над инфекцией. Необходимо более строгий контроль над применением антибиотиков, а также бдительный эпидемиологический контроль, чтобы предотвратить появление и распространение МЛУ изолятов *S. Enteritidis*.

Ключевые слова: *Salmonella enterica* serotum Enteritidis, множественная лекарственная устойчивость, интегроны 1-го класса.

Целью настоящей работы было выявление интегронов 1-го класса и исследование их роли в формировании фенотипов резистентности к антимикробным препаратам (АМП) штаммов *Salmonella enterica* подвида *enterica* серотипа Enteritidis (n = 29), изолированных от больных

сальмонеллезом в Инфекционной клинической больнице «Норк» (Ереван, Армения). Диагноз сальмонеллеза был подтвержден клинически и лабораторными методами исследования, серотип возбудителей идентифицирован в соответствии со стандартами [4].

Авторы:

Седракян А.М., к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории молекулярной генетики Института молекулярной биологии НАН РА, Ереван, Армения;

Аракелова К.А., магистр, научный сотрудник лаборатории молекулярной генетики Института молекулярной биологии НАН РА, Ереван, Армения;

Закарян М.К., магистр, младший научный сотрудник лаборатории молекулярной генетики Института молекулярной биологии НАН РА, Ереван, Армения;

Оганнисян А.И., к.б.н., научный сотрудник лаборатории молекулярной генетики Института молекулярной биологии НАН РА, Ереван, Армения;

Асоян А.В., к.м.н., доцент, директор Инфекционной клинической больницы «Норк» МЗ РА, Ереван, Армения;

Геворкян З.У., к.м.н., зав. лабораторной службы Инфекционной клинической больницы «Норк» МЗ РА, Ереван, Армения;

Мнацаканян А.А., врач-бактериолог Инфекционной клинической больницы «Норк» МЗ РА, Ереван, Армения;

Кцоян Ж.А., к.б.н., ведущий научный сотрудник, зав. лабораторией молекулярной генетики Института молекулярной биологии НАН РА, Ереван, Армения;

Бояджян А.С., д.б.н., профессор, директор Института молекулярной биологии НАН РА, Ереван, Армения;

Аминов Р., к.б.н., старший научный сотрудник, Национальный ветеринарный институт, Технический университет Дании, Копенгаген, Дания.

Адрес для переписки:

Седракян Анаит Микаеловна
0014, Республика Армения, Ереван, ул. Асратяна, 7, Институт молекулярной биологии НАН РА.
Тел.: (37410) 23-14-99 (служебн.); +3749 345-99-54 (моб.). Факс: (37410) 28-20-61.
E-mail: sedanahit@rambler.ru

поступила в редакцию 24.06.2013
отправлена на доработку 27.09.2013
принята к печати 14.10.2013

© Седракян А.М. и соавт., 2013

Чувствительность штаммов к АМП тестировали согласно стандартам CLSI [2] двумя методами: диско-диффузионным (диски Micromaster Laboratories Pvt. Ltd., India) и методом последовательных разведений в агаре для определения минимальной подавляющей концентрации (МПК). Тестирована чувствительность к 10 АМП: гентамицин (G), стрептомицин (Sm), амоксициллин+клавулановая кислота (Au), цефтриаксон (Cх), сульфаметоксазол (Su), триметоприм/сульфаметоксазол (Tm/Su), ампициллин (A), хлорамфеникол (Cm), ципрофлоксацин (Cp), тетрациклин (Tc). Наличие и типы интегров 1-го класса исследовали ПЦР-амплификацией *intI1* гена интегразы 1-го класса, варибельного сегмента (BC) и 3'-CS консервативного сегмента. Использованы наборы праймеров и условия ПЦР, описанные ранее [9]. Статистическую значимость межгрупповых различий определяли с использованием доверительных интервалов для биномиального распределения.

Из данных табл. следует, что наиболее высокий уровень чувствительности изолятов наблюдается по отношению к G — 89,7% (МПК ≤ 4 мг/л), затем к Tm/Su — 79,3% (МПК ≤ 2/38 мг/л), Cp и Cm — 75,9% (МПК ≤ 0,06 и ≤ 8 мг/л соответственно). По отношению к Tc уровень чувствительности составил 69% (МПК ≤ 4 мг/л), к Cx и Sm — 65,5% (МПК ≤ 1 и ≤ 32 мг/л соответственно), к Au — 62% (МПК ≤ 8/4 мг/л). Низкий уровень чувствительности был отмечен по отноше-

нию к A (37,9%, МПК ≤ 8 мг/л) и Su (39,7%, МПК ≤ 256 мг/л). Примечателен довольно высокий уровень умеренной устойчивости к Cp — 17,2% (0,12 мг/л ≤ МПК ≤ 0,5 мг/л).

Интегрон-положительными (*intI1*⁺) были 27,6% изолятов (табл., № 15–22). Среди выявленных интегров 1-го класса преобладал варибельный сегмент в 1000 п.н., представленный одиночно. Остальные изоляты были интегрон-отрицательными — *intI1*⁻ (табл., № 1–14).

Сравнительный анализ выявил повышенный уровень устойчивости *intI1*⁺ штаммов в сравнении с *intI1*⁻ (приведены в скобках) по отношению к: Tm/Su — 75% (0), p < 0,0001; Sm — 75% (19%), p < 0,01; Cm — 37,5% (9,5%), p < 0,05; Cx — 50% (19%), p < 0,05; Su — 100% (47,6%), p < 0,01; A — 75% (38,1%), p < 0,05. Примечательно, что устойчивыми к Tm/Su были только *intI1*⁺ штаммы.

Чувствительность ко всем тестируемым АМП проявили 17,2% изолятов (табл., № 1), которые (n = 5) были *intI1*⁻. Изоляты *intI1*⁺ были устойчивы к 2 и более классам АМП. Особо следует отметить, что 34,5% изолятов (n = 10, штаммы были повторно идентифицированы как *S. Enteritidis*), проявили устойчивость к 5 и более классам АМП, что довольно высокий показатель для серотипа. Устойчивость по меньшей мере к 5 классам АМП преобладала среди *intI1*⁺ изолятов (6 из 8) и реже наблюдалась (p < 0,001) среди *intI1*⁻ изолятов (4 из 21).

ТАБЛИЦА. ФЕНОТИПЫ УСТОЙЧИВОСТИ ИЗОЛЯТОВ К АНТИМИКРОБНЫМ ПРЕПАРАТАМ (АМП), НАЛИЧИЕ И ТИПЫ ИНТЕГРОНОВ 1-го КЛАССА

№	Число изолятов	Мишень ПЦР-амплификации (праймеры [9])			Фенотип устойчивости	Число классов АМП***
		<i>intI1</i> (1U-1D)	VS* (inF-inB) п.н.	3'-CS** (qacEΔ1-F sul1-B)		
1	5	-	-	-	-	0
2	1	-	-	-	Tc****	1
3	3	-	-	-	Su	1
4	1	-	-	-	A	1
5	1	-	-	-	AAu	2
6	1	-	-	-	A****Su	2
7	1	-	-	-	Tc****SuCх	3
8	2	-	-	-	A****SuAu****	3
9	1	-	-	-	ACp****AuCх****	4
10	1	-	-	-	ATcSuAu	4
11	1	-	-	-	ACp****SmTc****Cх	5
12	1	-	-	-	ACm****SmSuTcAu****	6
13	1	-	-	-	A****CmCpSmGSuTcCх	7
14	1	-	-	-	ACmCp****SmTc****AuCх	7
15	1	+	1000	+	SmG****Su	2
16	1	+	200, 400, 880	+	ASuTm/SuAuCх	4
17	1	+	1000, 1600	+	ACp****SuTm/SuTc****Cх	5
18	1	+	1000	+	ACmSmSuTm/SuCх	5
19	1	+	1000	+	ACmCp****SmSuTm/Su	5
20	1	+	1000	+	A****CmSmSuTm/SuAu****	5
21	1	+	1000	+	ACmSmSuTm/SuAu****Cх	6
22	1	+	200	+	ACpSmGTcSuAu****Cх	6

Примечания. * — варибельный сегмент интегрона; ** — 3'-консервативный сегмент интегрона; *** — число классов АМП к которым проявлена устойчивость; **** — умеренная устойчивость к препарату.

Фенотипы двух штаммов (табл., № 12 и № 13) содержали профиль устойчивости ACmSmSuTc, который характерен для изолятов серотипа *S. Typhimurium* фаготипа DT104 [6] и редко встречается среди изолятов *S. Enteritidis* [7, 8]. Примечательно, что оба отмеченных штамма не содержали интегрон 1-го класса и были чувствительны к триметоприму. Известно, что гены, кодирующие профиль устойчивости *S. Typhimurium* DT104, находятся в составе хромосомного геномного острова сальмонелл SGI1 [6]. SGI1 содержит ряд элементов лекарственной устойчивости, включая 2 интегрона с генными кассетами *bla*_{PSE-1} (устойчивость к Sm и спектиномицину) и *aadA2* (устойчивость к A), а также гены устойчивости к Tc и Cm, локализованные между интегронами. SGI1 — это интегративный мобилизуемый элемент, который может быть передан горизонтально другим серотипам [5, 6]. Варианты SGI1 были описаны в составе разных серотипов *S. enterica* [5, 6, 8]. Было показано, что некоторые большие IncA/C плазмиды множественной лекарственной устойчивости (МЛУ) с широким спектром хозяев способны мобилизовать SGI1 *in trans* [3].

Профили устойчивости 6 клинических изолятов отличались от фенотипа *S. Typhimurium* DT104 отсутствием устойчивости к одному из АМП (табл., № 14, 18–22), из них 5 изолятов были *intI1*⁺. Среди отмеченных изолятов, единственный *intI1*⁺ изолят (N14) не обладал устойчивостью к Su, один *intI1*⁺ изолят не был устойчив к Cm (№ 22), а в большинстве *intI1*⁺ изолятов не было устойчивости к Tc (№ 18–21). Примечательно, что последние 4 штамма проявили устойчивость и к Tm, то есть отсутствие устойчивости к Tc было их единственным отличием и от фенотипа устойчивости ACmSmSuTcTm, обусловленного серовар-специфической плазмидой вирулентности-резистентности pUO-SeVR1 [7]. Известно, что эта мобилизуемая плаزمид

(≈100 т.п.о.) содержит большинство детерминант вирулентности серовара, а также ряд генов устойчивости [*bla*_{TEM-1}, *catA2*, *strA-strB*, *sul1*, *sul2*, *tet(A)*], которые детерминируют фенотип ACmSmSuTcTm. Плазмиды также содержат интегрон 1-го класса с варибельным сегментом в 700 п.н. (*dfrA/Tm*) [7].

Генетические основы выявленных в работе фенотипов полирезистентности клинических изолятов могут быть неоднозначными. Специфичность выявленных фенотипов МЛУ с отсутствием одинаковых изолятов свидетельствует об отсутствии клонального распространения штаммов *S. Enteritidis*. Наиболее вероятным механизмом генерации такого разнообразия фенотипов МЛУ является интенсивный горизонтальный перенос генов резистентности к антибиотикам через конъюгативные плазмиды или транспозоны. Очевидна необходимость молекулярной характеристики генетических основ полирезистентности и оценки степени родственности тестируемых изолятов *S. Enteritidis*.

Таким образом, в данной работе выявлен высокий уровень МЛУ среди клинических изолятов *S. Enteritidis* и обнаружены редкие для серотипа фенотипы МЛУ. Полученные результаты указывают на вклад интегрона 1-го класса в формирование фенотипов МЛУ изолятов *S. Enteritidis*. Следует отметить, что в наших работах до 2006 г. фенотип МЛУ среди клинических изолятов *S. Enteritidis* не был зарегистрирован ни разу [1]. Результаты настоящей работы свидетельствуют о быстром и широкомасштабном проникновении генов резистентности к антибиотикам в популяции *S. Enteritidis*, что крайне затрудняет контроль над данной инфекцией. Необходим более строгий контроль над применением антибиотиков, а также бдительный эпидемиологический контроль, чтобы предотвратить появление и распространение МЛУ изолятов *S. Enteritidis*.

Список литературы

1. Седракян А.М., Мнацаканян А.А., Геворкян З.У., Аракелова К.А. Мониторинг антибиотикорезистентности штаммов *Salmonella*, циркулирующих в Армении // Доклады НАН РА. — 2007. — Т. 7, № 1. — С. 87–93.

Ссылки 2–9 см. в References (с. 358). See References for numbers 2–9 at p. 358.

MULTIDRUG-RESISTANCE AND PRESENCE OF CLASS 1 INTEGRONS IN CLINICAL ISOLATES OF *SALMONELLA ENTERICA* SEROTYPE ENTERITIDIS, CIRCULATING IN ARMENIA

Sedrakyan A.M.^a, Arakelova K.A.^a, Zakaryan M.K.^a, Hovhanisyan A.I.^a, Asoyan A.V.^b, Gevorgyan Z.U.^b, Mnatsakanyan A.A.^b, Ktsoyan Z.A.^a, Boyajyan A.S.^a, Aminov R.^c

^a Institute of Molecular Biology of National Academy of Sciences of the Republic of Armenia, Yerevan, Armenia

^b "Nork" Clinical Hospital of Infectious Diseases, Ministry of Health of the Republic of Armenia, Yerevan, Armenia

^c National Veterinary Institute, Technical University of Denmark, Copenhagen, Denmark

Abstract. The aim of this work was detection of class 1 integrons and their contribution to the antimicrobial resistance phenotypes in strains of subspecies *enterica* serotype *Enteritidis*. *S. Enteritidis* strains (n = 29) were isolated from patients

with salmonellosis at “Nork” Clinical Hospital of Infectious Diseases, Yerevan, Republic of Armenia. High prevalence of multi-drug resistance (MDR) phenotypes was revealed and isolates with MDR phenotypes which are rare in the *S. Enteritidis* serotype were observed. Class 1 integrons were detected in 27,6% of isolates, with the prevalence of a variable region of 1000 bp. Occurrence of the MDR phenotype was more frequent in integron-positive isolates compared to integron-negative isolates of *S. Enteritidis*. Further studies are necessary to reveal the genetic background of MDR phenotypes and to estimate the genetic kinship among the isolates. Our results suggest a rapid and large-scale penetration of antibiotic resistance genes into populations of *S. Enteritidis*, which complicates infection control. More rigorous regulations should be imposed on antibiotic use, together with a vigilant epidemiological surveillance, to prevent the emergence and spread of MDR *S. Enteritidis*.

Key words: *Salmonella enterica* serotype *Enteritidis*, multidrug-resistance, class 1 integrons.

Authors:

Sedrakyan A.M. ✉, PhD (Biology), Senior Researcher, Laboratory of Molecular Genetics, Institute of Molecular Biology, National Academy of Sciences, Republic of Armenia.

0014, Republic of Armenia, Yerevan, Asratyan str., 7.

Phone: (37410) 23-14-99 (office); +3749 345-99-54 (mobile). Fax: (37410) 28-20-61. E-mail: sedanahit@rambler.ru;

Arakelova K.A., Master's degree, Researcher, Laboratory of Molecular Genetics, Institute of Molecular Biology, National Academy of Sciences, Yerevan, Armenia;

Zakaryan M.K., Master's degree, Junior Researcher, Laboratory of Molecular Genetics, Institute of Molecular Biology, National Academy of Sciences, Yerevan, Armenia;

Hovhannisyan A.I., PhD (Biology), Researcher, Laboratory of Molecular Genetics, Institute of Molecular Biology, National Academy of Sciences, Yerevan, Armenia;

Asoyan A.V., PhD (Medicine), Associate Professor, Director, “Nork” Clinical Hospital of Infectious Diseases, Ministry of Health of Republic of Armenia, Yerevan, Armenia;

Gevorkyan Z.U., PhD (Medicine), Head of the Laboratory Services, “Nork” Clinical Hospital of Infectious Diseases, Ministry of Health of Republic of Armenia, Yerevan, Armenia;

Mnatsakanyan A.A., Bacteriologist, “Nork” Clinical Hospital of Infectious Diseases, Ministry of Health of Republic of Armenia, Yerevan, Armenia;

Ktsoyan Z.A., PhD (Biology), Leading Researcher, Head of the Laboratory of Molecular Genetics, Institute of Molecular Biology, National Academy of Sciences, Yerevan, Armenia;

Boyajyan A.S., PhD, MD (Biology), Professor, Director, Institute of Molecular Biology, National Academy of Sciences, Yerevan, Armenia;

Aminov R., PhD (Biology), Senior Researcher, National Veterinary Institute, Technical University of Denmark, Copenhagen, Denmark.

References

1. Sedrakyan A.M., Mnatsakanyan A.A., Gevorkyan Z.U., Arakelova K.A. Monitoring antibiotikorezistentnosti shtammov *Salmonella*, tsirkuliruyushchikh v Armenii [Monitoring of antibiotic resistance of *Salmonella* strains circulating in Armenia]. *Doklady NAN RA — Reports of NAS RA*, 2007, vol. 107, no. 1, pp. 87–93.
2. CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty-second informational supplement. *M100-S22*, vol. 32, no. 3. Wayne, PA, USA, 2012.
3. Douard G., Praud K., Cloeckert A., Doublet B. The *Salmonella* genomic island 1 is specifically mobilized in trans by the *incA/C* multidrug resistance plasmid family. *PLoS ONE*, 2010, vol. 5, no. 12, pp. e15302.
4. Grimont P.A., Weill F.-X. Antigenic formulae of the *Salmonella* serovars. 9th ed. *WHO Collaborating centre for reference and research on Salmonella, Institut Pasteur, Paris, France*, 2007.
5. Krauland M.G., Marsh J.W., Paterson D.L., Harrison L.H. Integron-mediated multidrug resistance in a global collection of non-typhoidal *Salmonella enterica* isolates. *Emerg. Infect. Dis.*, 2009, vol. 15, no. 3, pp. 388–396.
6. Mulvey M.R., Boyd D.A., Olson A.B., Doublet B., Cloeckert A. The genetics of *Salmonella* genomic island 1. *Microbes Infect.*, 2006, vol. 8, pp. 1915–1922.
7. Rodríguez I., Rodicio M.R., Guerra B., Hopkins K.L. Potential international spread of multidrug-resistant invasive *Salmonella enterica* serovar *Enteritidis*. *Emerg. Infect. Dis.*, 2012, vol. 18, no. 7, pp. 1173–1176.
8. Velge P., Cloeckert A., Barrow P. Emergence of *Salmonella* epidemics: the problems related to *Salmonella enterica* serotype *Enteritidis* and multiple antibiotic resistance in other major serotypes. *Vet. Res.*, 2005, vol. 36, no. 3, pp. 267–288.
9. Zhang H., Shi L., Li L., Guo S., Zhang X., Yamasaki Sh., Miyoshi Sh., Shinoda S. Identification and characterization of class 1 integron resistance gene cassettes among *Salmonella* strains isolated from healthy humans in China. *Microbiol. Immunol.*, 2004, vol. 48, no. 9, pp. 639–645.

Received 24.06.2013

Revision received 27.09.2013

Accepted 14.10.2013